

1321

JP07031476A

MicroPatent Report

**DNA FRAGMENT HAVING PROMOTER FUNCTION IN
CORYNEFORM BACTERIUM**

[71] Applicant: MITSUBISHI CHEM

[72] Inventors: HATAKEYAMA KAZUHISA;
KOBAYASHI MIKI;
YUGAWA HIDEAKI

[21] Application No.: JP05183595

[22] Filed: 19930726

[43] Published: 19950203

ABSTRACT OF THE DISCLOSURE
The present invention relates to a DNA fragment having a promoter function in a coryneform bacterium, having increasing action on the expression intensity of a structural gene and useful for producing, etc., an amino acid, etc. The DNA fragment contains a base sequence, expressed by the formula and having the promoter function in a coryneform bacterium derived from a gene coding a diaminopelargonate aminotransferase and a desthiobiotin synthetase in the coryneform bacterium.

Go to Fulltext

[57] Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject DNA fragment, containing a specific base sequence having the promoter function in a specified coryneform bacterium, having increasing action on the expression intensity of a structural gene and useful for producing, etc., an amino acid, etc. **CONSTITUTION:** This DNA fragment contains a base sequence, expressed by the formula and having the promoter function in a coryneform bacterium derived from a gene coding a diaminopelargonate aminotransferase and a desthiobiotin synthetase in the coryneform bacterium.

[51] Int'l Class: C12N01509 C12N01509 C12R00113



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-31476

(43) 公開日 平成7年(1995)2月3日

(51) Int.Cl. ⁹	識別記号	片内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A			
// (C 1 2 N 15/09	Z N A			
C 1 2 R 1:13)				

9050-4B

C 1 2 N 15/ 00

Z N A A

(C 1 2 N 15/ 00

Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-183595

(22) 出願日 平成5年(1993)7月26日

(71) 出願人 000006057

三菱油化株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72) 発明者 畠山 和久

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72) 発明者 小林 幹

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(72) 発明者 湯川 英明

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱油化株式会社筑波総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 山本 隆也

(54) 【発明の名称】 コリネ型細菌内でプロモーター機能を有するDNA断片

(57) 【要約】

【構成】 プレバクテリウム・フラバムMJ-233染色体から単離されたジアミノベラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子に由来する285塩基対より成るプロモーター機能を有するDNA。

【効果】 このプロモーター機能を有するDNA断片を、タンパク質をコードする構造遺伝子とともにプラスミドベクターに組み込み宿主コリネ型細菌に導入した時に、該構造遺伝子が高発現する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネ型細菌内のジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオピオチンシンセ

AGTCCTGTTG CTTGGGTTTG ATCAAGGCGT AATCCACCGG CTGCAACATC AAAATACAGG 60
TAGTACACCA AGAGTGCTTG CATGCCGTAG AAGCTGAATC GCTCCACAT TCAATACTG 120
ATTATTGAGG TTGCGCTTTT GAACCTAACC CGTTGATCCA GTTGGACCAT GACTTCTCT 180
AACAGAAAGC TGCAGCAATG AAAACACTT AGTGCCAAAA ATTGAACACT GTTCAATTAA 240
CCTATTACAC TGCACATATG CAACCAAAACC AAGTGACGGA GAAAA 285

を含むDNA断片。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はコリネ型細菌内のジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオピオチンシンセターゼをコードする遺伝子に由来するコリネ型細菌内でプロモーター機能を有する新規なDNAを含むDNA断片に関する。

【0002】

【従来の技術】プレバクテリウム属細菌を含むコリネ型細菌は、アミノ酸、有機酸、プリンヌクレオチド等を生産する工業的に有用な微生物であるが、組換えDNA技術の導入による菌株の育種改良は、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 等に比べて遅れている。特に、プラスミドベクターに挿入された構造遺伝子のコリネ型細菌内での発現のために必要なプロモーターの構造に関する知見は極めて少く、コリネ型細菌を宿主として用いて構造遺伝子を発現させようとする場合にはかなり問題となっている。

【0003】一方、本発明者らは先にコリネ型細菌染色体からピオチン生成に関与するジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオピオチンシンセターゼをコードする遺伝子を単離し提案した(特願平3-174757号明細書参照)。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の主たる目的は、プラスミドベクターに挿入された構造遺伝子をコリネ型細菌内で確実に発現せしめるようなプロモーター機能を有する新規なDNA断片を取得することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、コリネ型細菌内でプロモーター機能を有するDNAを鋭意検索した結果、本発明者が先に提案したコリネ型細菌内のジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオピオチンシンセターゼをコードする遺伝子(以下これを「bioAbioD」ということがある;特願平3-174757号明細書参照)上流の285bpのDNAがコリネ型細菌内でプロモーター機能を有することを見だし、本発明を完成するに至った。

【0006】すなわち、本発明は、コリネ型細菌内のジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオピオチンシンセターゼをコードする遺伝子(bio

ターゼをコードする遺伝子に由来するコリネ型細菌内でプロモーター機能を有する下記の塩基配列:

AbioD)に由来するコリネ型細菌内でプロモーター機能を有する後記配列表の配列番号:1に示される285bpの塩基配列を含むDNA断片である。以下、本発明についてさらに詳細に説明する。

【0007】本明細書において、「プロモーター機能を有するDNA」とは、遺伝子の転写を開始するためにRNAポリメラーゼが特異的に結合するDNA上の領域であって、タンパク質をコードする構造遺伝子とともにプラスミドベクターに組み込まれ宿主コリネ型細菌に導入された時に、該構造遺伝子の発現強度の増加作用を有するDNAを意味する。

【0008】本発明のプロモーター機能を有するDNAは、通常はコリネ型細菌内のbioAbioDを含むDNA断片から得ることができる。上記bioAbioDを含むDNA断片の供給源となる微生物は、コリネ型細菌であれば特に限定されるものではないが、一般的には、プレバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)およびその由来株、プレバクテリウム・アンモニアゲネス(*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC6871、同ATCC13745、同ATCC13746、プレバクテリウム・デバリカタム(*Brevibacterium divaricatum*) ATCC14020、プレバクテリウム・ラクトファーメンタム(*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831等が有利に使用される。

【0009】これらの供給源微生物からbioAbioDを含むDNA断片を調製するための基本操作の一例を述べれば次のとおりである。上記bioAbioDを含む断片は、上記コリネ型細菌、例えばプレバクテリウム・フラバムMJ-233株(FERM BP-1497)の染色体上に存在し、この染色体を適当な制限酵素で切断することにより生ずる切断断片の中から以下に述べる方法で分離、取得することができる。

【0010】まず、プレバクテリウム・フラバムMJ-233株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えばSau3A1を用いて、DNA断片の大きさが約20~30kbになるように部分分解する。得られたDNA断片をコスミドベ

クター例えばpWE15に挿入し、このコスミドを、λ DNA in vitro Packaging Kitを用いる形質導入により、bioAあるいはbioDの欠損した大腸菌変異株 (Journal of Bacteriology, vol 94, p2065-2066, 1967及びJournal of Bacteriology, vol 112, p830-839, 1972参照) に導入する。この大腸菌変異株を、ピオチンを含まない選択培地に塗抹する。

【0011】得られる形質転換株よりコスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたプレバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のbioAbioDを含む断片を確認・取得することができる。かくして得られるbioAbioDを含む断片は、大きさが約20~30kbと大きく、実用的でない、さらに短い断片に特定化する必要がある。

【0012】次に、上記で得られたbioAbioDを含む断片を含むコスミドを適当な制限酵素を用いて切断し、得られるDNA断片を、大腸菌で複製可能なベクタープラスミドに挿入しこのベクタープラスミドを通常用いられる形質転換法、例えば、塩化カルシウム法あるいは電気パルス法による形質転換により、前記bioAあるいはbioDの欠損した大腸菌変異株に導入する。この大腸菌変異株を、ピオチンを含まない選択培地に塗抹する。

【0013】得られる形質転換株よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたプレバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のbioAbioDを含む断片を確認・取得することができる。このようにして得られるbioAbioDを含む断片の一つは、前記プレバクテリウム・フラバムMJ-233株の染色体DNAを制限酵素Sau3AIの部分分解により切り出し、さらにそれを、制限酵素Sa

1Iで切り出すことによって得られる大きさが約4.0kbのDNA断片を挙げることができる。

【0014】この約4.0kbのbioAbioDを含むDNA断片を、各種の制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記表1に示す。なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片又はプラスミドを、過剰の制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動および4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0015】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのラムダファージ (λ phage) のDNAを制限酵素HindIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ (φ x 174 phage) のDNAを制限酵素HaeIIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリルアミドゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出する。プラスミドの大きさは、切断断片それぞれの大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1kb以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によって得られる結果を採用し、約0.1kbから1kb未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られる結果を採用した。

【0016】

【表1】

表1

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamHI	1	0.8, 3.2
DraII	1	1.2, 2.8
SacI	1	1.8, 2.2
XhoI	1	1.3, 2.7

【0017】上記表1中、2.7kbのXhoI切断断片もまたジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオピオチンシンセターゼをコードする機能を有していることが確認されており、bioAbioDは、プレバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体DNAを制限酵素SalI及びXhoIで切り出すことによって得られる大きさが約2.7kbのDNA断片中に含まれるものと考えられる。

【0018】以上に詳述した大きさが約4.0kbのbioAbioDを含むDNA断片の制限酵素切断点を図1に示す。上記したプレバクテリウム・フラバムMJ

-233の染色体を、制限酵素SalIを用いて切り出すことにより得られる大きさが約4.0kbのDNA断片を用いて、その塩基配列をプラスミドpUC18またはpUC19を用いるジデオキシヌクレオチド終断法 (dideoxy chain termination法) (Sanger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 74, 5463, 1977) により決定することができる。このようにして決定した塩基配列中に423個のアミノ酸をコードする1269塩基対より成るbioAオープンリーディングフレームおよび224個のアミノ酸をコードする67

2塩基対より成るbioDオープンリーディングフレームが存在し(特願平3-174757号明細書参照)、該オープンリーディングフレームの上流部分がプロモーター機能を有すると考えられた。

【0019】次に、該オープンリーディングフレームの上流部分のプロモーター機能を有すると考えられるDNA領域の上流および下流の配列に相当する適当な塩基配列、例えば後記配列表の配列番号：2および配列番号：3に示される塩基配列を化学合成し、これをプライマーDNAとして用いて、プロモーター機能を有すると考えられるDNA領域を増幅することができる。プライマーDNAの合成は、例えばベックマン社製DNA合成機System-1 Plusを用いて合成でき、DNA領域の増幅は、例えばDNAサーマルサイクラー408型(宝酒造社製)を用いてNature, 324, p 163 (1986年)に記載の方法により行うことができる。かくして得られる増幅DNA断片がコリネ型細菌内でプロモーター機能を有することは、該DNA断片をコリネ型細菌内で自律増殖可能なプロモーター検出用ベクターに組み込むことによって確認することができる。

【0020】「コリネ型細菌内で自律増殖可能なプロモーター検出用ベクター」としては、例えば、コリネ型細菌内で自律増殖可能なDNA断片(a)と、プロモーターが欠失している発現されるべきタンパク質をコードする構造遺伝子を含むDNA断片(b)(以下これを「発現されるべき遺伝子」と略称することがある)とを保有するプラスミドであれば特に制限はない。このプラスミド検出用ベクターの具体例としては、コリネ型細菌内で自律増殖可能なDNA断片(a)としてプレビバクテリウム・スタチオニス(Brevibacterium stationis)IFO12144(FERM BP-2515)由来のプラスミドpBY503を制限酵素KpnIで切り出すことによって得られる約6kbのDNA断片、プロモーターが欠失している発現されるべきタンパク質をコードする構造遺伝子を含むDNA断片(b)としてエシエリヒア・コリのトランスポゾンTn9由来のクロラムフェニコール耐性遺伝子であるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)をコードする遺伝子を保有するプラスミドpPR3(特願平3-147792号明細書参照)を挙げることができる。

【0021】次に、上記プラスミド検出用ベクターを用いてプロモーター機能を有するDNA断片の検出法を述べる。まず、上記プラスミド検出用ベクターを、それ自体既知の通常用いられる形質転換法、例えば電気パルス法(Agricultural and Biological chemistry, 54, 443, (1990)参照)等で前記コリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムMJ-233(FERMBP-1497)へ導入し、形質転換株を適当な培地で培養し、プロ

モーターが欠失している発現されるべき遺伝子(b)が発現しないことを確認しておく。ここで、プロモーターが欠失している発現されるべき遺伝子(b)の発現の有無および発現強度の測定は、該遺伝子(b)が薬剤耐性遺伝子である場合はその薬剤を含有する選択培地で培養し、形質転換株の薬剤感受性を調べることで容易に行うことができる。また発現の有無および発現強度は、形質転換株を通常用いられる培地で培養し、培地中の発現されるべき遺伝子(b)の発現産物を、該遺伝子の発現産物の性質を利用して調べることもできる。

【0022】次に、発現されるべき遺伝子(b)がコリネ型細菌内で発現していないことが確認できたプラスミド検出用ベクター、例えばpPR3の発現されるべきCAT遺伝子の上流部位を適当な制限酵素、例えばBamHIで解裂し、該部位に前記bioAbioDを含むDNA断片由来の増幅DNAをDNAリガーゼ処理により連絡し、コリネ型細菌へ電気パルス法等により導入する。得られる形質転換株を培養し、前記した発現されるべき遺伝子(b)の確認法により、形質転換株の該遺伝子の発現の有無及び強度を調べることにより、挿入されたDNA断片のプロモーター機能を確認することができる。

【0023】かくして得られる本発明のプロモーター機能を有するDNA断片としては、後記配列表の配列番号：1に示される285塩基対より成るDNAを挙げることができる。上記した後記配列表の配列番号：1に示される塩基配列を包含して成る本発明のプロモーター機能を有するDNA断片は、天然のコリネ型細菌染色体DNAから分離されたbioAbioDを含むDNA断片に由来するもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばベックマン社製System-1 Plusを用いて合成されたものであってもよい。

【0024】また、前記の如くプレビバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAから増幅して得られる本発明のDNA断片は、プロモーター機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明のプロモーター機能を有するDNA断片に包含されるものである。

【0025】

【実施例】次に実施例により本発明をさらに具体的に説明する。しかしながら、下記の実施例は本発明について具体的な認識を得る一助としてのみ挙げたものであり、これによって本発明の範囲は何ら限定されるものではない。

【0026】実施例1

プレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来のジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチ

オビオチンシンセターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (bioAbioD断片) のクローニング

(A) プレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNAの抽出

半合成培地A培地 (組成: 尿素 2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7g、 K_2HPO_4 0.5g、 KH_2PO_4 0.5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$ 6mg、酵母エキス 2.5g、カザミノ酸 5g、ビオチン 200 μg 、塩酸チアミン 200 μg 、グルコース 20g、蒸留水 1リットル) 1リットルに、プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を 10mg/ml の濃度にリゾチームを含む 10mM NaCl -20mM トリス緩衝液 (pH 8.0) -1mM EDTA-2Na 溶液 15ml に懸濁した。次にプロテナーゼ K を、最終濃度が 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、37℃ で 1 時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が 0.5% になるように添加し、50℃ で 6 時間保温して容菌した。この溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で 10 分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離 (5,000 $\times g$ 、20 分間、10~12℃) し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを 0.3M となるように添加した後、2 倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在する DNA をガラス棒でまきとり、70% エタノールで洗浄した後、風乾した。得られた DNA に 10mM トリス緩衝液 (pH 7.5) -1mM EDTA-2Na 溶液 5ml を加え、4℃ で一晩静置し、以後の実験に用いた。

【0027】 (B) 組換え体の創製

上記 (A) 項で得たプレバクテリウム・フラバムMJ-233 の全 DNA 90 μl を制限酵素 Sau3A I 1 unit を用い、37℃ で 20 分間反応させ部分分解した。この部分分解 DNA にコスミド pWE15 (ストラタジーン社製) を制限酵素 Bam HI で切断した後、脱リン酸化処理したものを混合し、50mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10mM ジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl_2 及び T4 DNA リガーゼ 1 unit の各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、4℃ で 15 時間反応させ、結合させた。

【0028】 (C) ビオチン合成に関与する酵素をコードする遺伝子を含むコスミドの選抜

上記 (B) 項で得たコスミド混液を用い、前記エシェリヒア・コリ R873 (bioA4) 株を形質導入し、アンピシリン 50mg を含む選択培地 [K_2HPO_4 7g、 KH_2PO_4 2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、カザミノ酸 10g、グルコース 2g 及び寒天 16g を蒸留水 1リットルに溶解] に塗抹した。なお形質導入には、宝酒造より販売さ

れている λ DNA in vitro Packaging Kit を用いて行った。培地上の生育株を常法により、液体培養し、培養液よりコスミド DNA を抽出し、該コスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、コスミド pWE15 の長さ 8.8kb の DNA 断片に加え、長さ約 30kb の DNA 断片が認められた。本コスミドを pWE15-bioA と命名した。

【0029】 (D) bioAbioD断片のプラスミド pBluescript II へのサブクローニング

上記 (C) 項で得たコスミド pWE15-bioA に含まれる DNA 挿入断片は約 30kb と大きく、実用的でないため、得られた断片のうち必要な部分だけに小型化するために、プラスミド pBluescript II (ストラタジーン社より市販) ヘジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオビオチンシンセターゼをコードする遺伝子 (bioAbioD) を含む DNA 断片を下記のとおりサブクローニングした。

【0030】 上記 (C) 項で得たコスミド pWE15-bioA を制限酵素 Sal I で切断したものと、プラスミド pBluescript II を制限酵素 Sal I で切断したものを混合し、50mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10mM ジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl_2 及び T4 DNA リガーゼ 1 unit の各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、12℃ で 15 時間反応させ、結合させた。

【0031】 得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法 (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) に従いエシェリヒア・コリ R873 (bioA4) 株を形質転換し、アンピシリン 50mg を含む選択培地 [K_2HPO_4 7g、 KH_2PO_4 2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、カザミノ酸 10g、グルコース 2g 及び寒天 16g を蒸留水 1リットルに溶解] に塗抹した。

【0032】 この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミド DNA を抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミド pBluescript II の長さ 3.95kb の DNA 断片に加え、長さ 4.0kb の挿入 DNA 断片が認められた。このプラスミドを用い、上記方法に従い前記エシェリヒア・コリ R877 (bioD19) 株を形質転換し、アンピシリン 50mg を含む選択培地 [K_2HPO_4 7g、 KH_2PO_4 2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、カザミノ酸 10g、グルコース 2g 及び寒天 16g を蒸留水 1リットルに溶解] に塗抹した。

【0033】 この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミド DNA を抽出し、該プラスミ

ドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、エシェリヒア・コリ R877 (bioA4) 株の形質転換体から得られたプラスミドと全く同様に、プラスミド pBluescript II の長さ 2.95 kb の DNA 断片に加え、長さ約 4.0 kb の挿入 DNA 断片が認められた。長さ約 4.0 kb の DNA 断片を各種の制限酵素で切断したときの制限酵素認識

表2 プラスミド pBS-bioA4

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
HindIII	1	6.95
XhoI	2	4.25, 2.7
BamHI	2	3.75, 3.2

上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドを pBS-bioA4 と命名した。

【0035】以上の結果より、制限酵素 SalI で切り出される、ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼとデスチオビオチンシンターゼをコードする遺伝子を含む長さ 4.0 kb の DNA 断片を得ることができた。

【0036】実施例2

bioA及びbioD遺伝子を含むDNA断片の塩基配列の決定

(A) デレーションミュータントの作製

実施例1で得られたプラスミド pBS-bioA4 (pBluescript II の SalI サイトに 4.0 kb の断片が挿入されたプラスミド) 30 µg を制限酵素 XbaI を用いて 37℃、1時間反応により切断した。この反応液を 75℃ で 15分間加熱して制限酵素を失活させたのち、1mM thio-dNTP を 2 µl、クレノー断片 (klenow fragment) 5 units を加え、室温で 10分間反応した。反応液と同量のフェノール/クロロホルム (1:1) で切断断片を抽出したのち、2.5倍量のエタノールを加え DNA を沈殿させた。遠心分離後、真空乾燥し DNA を回収した。この DNA を溶解し、制限酵素 EcoRI を用いて 37℃、1時間反応により切断した。この溶液と同量のフェノール/クロロホルム (1:1) で DNA 断片を抽出したのち、2.5倍量のエタノールを加え DNA を沈殿させ、遠心分離後、真空乾燥し、DNA を回収した。得られた DNA を 100 µl の ExoIII バッファー [50mM TrisHCl (pH8.0), 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 10mM β-メルカプトエタノール] に溶解した。この DNA 溶液に 180 units のエキソヌクレアーゼ III を加え、ボルテックスにて攪拌し、37℃にて反応した。この溶液を 1分毎に 10 µl ずつ、予め準備した 100 µl の MB ヌクレアーゼ バッファー [40mM 酢酸ナトリウム pH 4.5, 100mM NaCl, 10% グリセロール] 中へ順次加え、65℃、5分間の処理によりエキソヌクレアーゼ III を失活させた後、37℃にもどし、50 u

部位数および切断断片の大きさは、前記表1に示したとおりであった。この DNA 断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。また上記で得られたプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記の表2に示す。

【0034】

【表2】

nits の Mung Bean ヌクレアーゼを加え、30分間反応した。同量の 10mM TrisHCl-1mM EDTA 飽和フェノールで1回、上清をクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) で1回 DNA をそれぞれ抽出した。上清に、2.5倍量のエタノールを加え、遠心分離にて沈殿を回収し、70%エタノールで洗浄したのち真空乾燥した。得られた DNA を 50 µl のクレノーバッファー [7mM TrisHCl (pH7.5), 0.1mM EDTA, 20mM NaCl, 7mM MgCl₂, 0.1mM dNTPs] に溶解させた後、2 units のクレノー断片を加え、37℃、15分間反応した。この溶液に 2.5倍量のエタノールを加え、遠心分離にて沈殿を回収し、70%エタノールで洗浄後、真空乾燥した。得られた DNA を 40 µl の TE バッファーに溶解し、10mM ジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂ および T4 DNA リガーゼ 5 units の各成分を添加し、12℃で15時間反応させ結合した。得られた DNA 混合物を用いてエシェリヒア・コリ JM109 (宝酒造社製) を形質転換し、アンピシリンを 50 µg/ml 含む LB 培地 [10g トリプトン, 5g 酵母抽出物, 5g NaCl, 16g agar/1l] に塗抹した。生育したコロニーよりプラスミドを抽出し、インサート DNA の大きさをしらべ、インサートの大きさが 200 bp から 4 kb まで約 250 bp おきに 20 クローンを選抜した。同様にして逆方向のクローンについても 20 クローン選抜した。

【0037】(B) ディデオキシ (dideoxy) 法によるデレーションミュータントの塩基配列の決定

上記で得られた菌体を白金耳で 10ml の 2×TY 培地 [16g トリプトン, 8g 酵母抽出物, 5g NaCl/1l] に植菌し、150 µg/ml になるようにアンピシリンを添加した。37℃で O.D. が 0.3 になるまで生育させた後、ヘルパーファージ M13KO7 を 10⁸ /ml になるように添加した。37℃で1時間培養した後、25分の1量を新しい 10ml の 2×TY 培地に植菌し、カナマイシンを 70 µg/ml になるように添加し、37℃で12時間培養した。培養液 1.5 ml

をエッペンドルフチューブに分注し、遠心し菌体をのぞき、上清の1.2mlを新しいエッペンドルフチューブにうつした。200 μ lのPEG/NaCl溶液〔20%PEG, 2.5M NaCl〕を加え室温で15分間静置した。遠心により上清をのぞき沈殿を回収した。沈殿を100 μ lのTEバッファーに懸濁し、50 μ lのTE飽和フェノールを加えDNAを抽出した。上清に、10 μ lの3M酢酸ナトリウム250 μ lのエタノールを加えDNAを沈殿として回収した。真空乾燥させ、30 μ lのTEバッファーに溶解した。シーケンスの反応にはシーケナーゼVer. 2.0 DNAシーケンシングキット（東洋紡製）を用いた。4つのシーケンスレーン用にまず1つのチューブの中で、アニーリング、及びラベリングを行なった。エッペンドルフチューブに1 μ lのプライマー、2 μ lのシーケンス用バッファー、7 μ lの上記で調製したDNA溶液を入れ、よく混合し55℃で1時間反応した。4倍に希釈したラベリング反応液を2 μ l加え、さらに1 μ lの0.1M DTT, 5 μ Ciの α -³⁵S dCTP, 2 μ lの希釈シーケナーゼを加え、37℃で5分間反応した。A, G, C, T用のターミネーションミックスを十本のチューブに2.5 μ lずつ分注し、ラベリング反応が終了した反応液を3.5 μ lずつ分注した。37℃で5分間反応した後、反応停止液を4 μ lずつ添加した。各反応液を3 μ lずつゲルにのせ、1500Vで4時間電気泳動を行ない、X線フィルムにてバンドを検出した。塩基配列決定の結果、図1において、SacIの上流132bpからBamHIの下流100bpまでにbioAをコードしていると考えられるオープンリーディングフレーム、BamHIの下流に7bpからSalIの34bp上流にbioDをコードしていると考えられるオープンリーディングフレーム（特願平3-174757号明細書参照）、さらに、SacIの上流429bpから133bpのあいだにプロモーター機能を有すると考えられる後記配列表の配列番号：1に示す285塩基対の領域が存在していた。

【0038】実施例3

プロモーター機能を有するDNA断片の単離

(A) DNA領域の増幅に使用するプライマーDNAの合成

実施例2において決定したbioAbioDを含むDNA断片の配列をもとに、SacIサイトの上流429bpから133bpの配列番号：1に示される285塩基対の領域を増幅してクローニングするために、5' → 3' プライマーとして、5' -CCGGATCCAGT CCTGTTGCTTGGGTTTG-3'（配列番号：2）、3' → 5' プライマーとして、5' -CCG GATCCTTTTCCTCCGTCACCTTGGTTT-3'（配列番号：3）の28merをベックマン社製DNA合成機System-1plusを用いて合成し

た。

【0039】(B) プロモーター機能を有する断片の増幅

反応液〔50mM KCl, 10mM TrisHCl (pH8.8), 1.5mM MgCl₂, 100 μ g/mlゼラチン, 200 μ MdNTPs, 250pmo1プライマー〕に、2.5unitsのTaqポリメラーゼ、1ngのDNAを添加し、ディネーチャー94℃1分間、アニーリング37℃、2分間、ポリメライゼーション72℃、3分間の反応を、DNAサーマルサイクラー408型（宝酒造社製）で25回くりかえすことによりDNA断片を増幅させた。増幅DNA断片の確認は4%アガロースゲル電気泳動により285塩基対のDNA断片を視認することにより行なった。

【0040】実施例4

プロモーター機能を有するDNA断片のプラスミドpPR3への導入

特願平3-147792号明細書の記載に基づいて調製したプラスミドpPR30.5 μ gに制限酵素BamHI（5units）を37℃で1時間反応させ、プラスミドDNAを完全に分解した。

【0041】実施例3で調製したプロモーター機能を有するDNA断片とプラスミドDNA分解物を混合し、制限酵素を不活化するために65℃で10分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々50mMトリス緩衝液pH7.6、10mM MgCl₂、1.0mMジチオスレイトール、1mM ATP及びT4DNAリガーゼ1unitになるように各成分を強化し、16℃で15時間保温した。この溶液を用いてエシエリヒア・コリHB101のコンピテントセル（宝酒造社製）を形質転換した。

【0042】形質転換株は50 μ g/ml（最終濃度）のカナマイシンを含むL培地〔トリプトン10g、酵母エキス5g、NaCl 5g、蒸留水1l、pH7.2〕で37℃にて24時間培養し、生育株として得られた。これら生育株のプラスミドをアルカリ-SDS法〔T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook; "Molecular cloning" (1982) 90~91参照〕により抽出した。

【0043】得られたプラスミドは電気パルス法によりプレバクテリウム・フラバMJ-233（FERMBP-1497）プラスミド除去株へ形質転換し、アルカリ-SDS法によりプラスミドを抽出した。このプラスミドの制限酵素BamHI、KpnI、SacI等の制限酵素による切断パターンによってpPR3に前記増幅DNAが組み込まれていることを確認し、このプラスミドを“pPR3-bioA”と命名した。

【0044】実施例5

プロモーター強度の測定：実施例4でpPR3に挿入し

たプロモーターの強度を、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) の活性を測定することによって調べた。

【0045】 pPR3を保有するブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株とpPR3-bioAを保有するブレビバクテリウム・フラバムMJ-233株をそれぞれ、実施例1の(A)項に記載の半合成培地A培地にカナマイシンを50 µg/ml加えた培地10mlの入った試験管で一晩前培養し、その培養液を上記の培地100mlの入った三角フラスコで約6時間培養後集菌し、CATの活性測定に用いた。CATの活性はW. V. Shawらの方法 [J. Bacteriology Jan. (1968) 28~36参照] により測定した。その結果、pPR3-bioAを有するMJ-233株は、プロモーターの挿入されていないpPR3を有するMJ-233株の約10倍のCAT活性をもってい

配列:

```
AGTCCTGTTG CTTGGGTTTG ATCAAGGCCT AATCCACCGG CTGCAACATC AAAATACAGG 60
TAGTACACCA AGAGTGCTTG CATGCCGTAG AAGCTGAATC GCTCCACAT TTCAATACTG 120
ATTATTGAGG TTGGCCTTTT GAACCTAACC CGTTGATCCA GTTGGAACAT GACTTCTCCT 180
AACAGAAAGC TCGGGCAATG AAAAACACTT AGTGCCAAAA ATTGAACACT GTTCAATTAA 240
CCTATTACAC TGCACATATG CAACCAAACC AAGTGACGGA GGAAA 285
```

【0047】 配列番号: 2

配列の長さ: 28

配列の型: 核酸

配列:

```
CCGGATCCAG TCCTGTTGCT TGGGTTTG 28
```

【0048】 配列番号: 3

配列の長さ: 28

配列の型: 核酸

配列:

```
CCGGATCCTT TCCTCCGTCA CTTGGTTT 28
```

【図面の簡単な説明】

【図1】 大きさが約4.0 kbのジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ及びデスチオビオチンシンセ

た。

【0046】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 285

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: genomic DNA

起源

生物名: ブレビバクテリウム フラバム (Brevibacterium flavum)

株名: MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号: Promoter

特徴を決定した方法: E

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

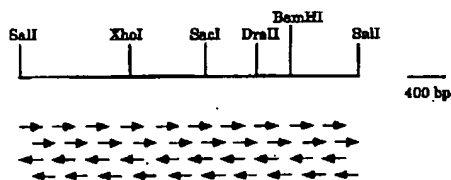
鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

ターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片の制限酵素による切断点地図、および塩基配列決定のための戦略図。

【図1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:13)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.